

明 細 書

ヒト組換えHGFを含有する皮膚潰瘍予防治癒剤

技術分野

- [0001] 本発明は、ヒト組換えHGFまたはヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有する皮膚潰瘍予防治癒剤、血管新生促進剤および肉芽増生促進剤に関する。

背景技術

- [0002] 種々の細胞増殖因子は皮膚において細胞の増殖や表皮細胞の遊走、またはアポトーシス(細胞死)あるいは細胞外マトリックス産生などを制御することによって皮膚の創傷治癒に関与している。またある種の増殖因子の投与によって正常動物における皮膚の創傷治癒が促進されること、あるいは皮膚の創傷治癒能が低下している糖尿病患者や、ステロイド投与あるいは栄養失調のモデル動物において増殖因子が皮膚の創傷治癒能の低下を代償することが報告されている(非特許文献1、非特許文献2)。例えば糖尿病マウスにおいては正常のマウスに比べ皮膚創傷治癒は遅延するが、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)、血小板由来増殖因子(platelet-derived growth factor)、インスリン様増殖因子-I(insulin-like growth factor-I)またはトランスフォーミング増殖因子- α (transforming growth factor- α)の局所投与が前記皮膚創傷治癒の遅延を抑制することが報告されている(非特許文献4-6)。さらに、組換えbFGFは皮膚潰瘍の治療薬として利用されている。
- [0003] 一方、成熟肝細胞に対する増殖促進因子として発見されたHGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子)は各種傷害に対して組織の再生ならびに保護を担う生理機能を有している(非特許文献7-10)。皮膚においてもHGFが表皮ケラチノサイト(角化細胞)またはメラノサイトの増殖や遊走を促進することが明らかにされ、HGFが皮膚の生理機能や創傷治癒に関与することが示唆された(非特許文献11-13)。本発明者らは、さらに皮膚の生理機能や創傷治癒に対するHGFの役割について検討を重ね、組換えHGFを有効成分とする創傷治療または皮膚潰瘍治療剤を開発し、特許を得ている(特許文献1)。その後の研究でも、実験動物においてHGFが

皮膚創傷治癒に関与することが支持されている。例えば、HGFならびにc-Met/HGFレセプターの発現は皮膚創傷に応じて増加する(非特許文献14、非特許文献15)。HGFを過剰発現するトランスジェニックマウスにおいて皮膚創傷後の血管新生や肉芽組織の形成の加速が見られる(非特許文献16)。一方、皮膚創傷治癒モデルにおいて抗HGF抗体の投与によって内因性HGFの作用をブロックすると表皮の再生や血管新生が抑制され治癒が遅延する(非特許文献15)。

しかし、上記文献には、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFについては記載も示唆もされていない。

[0004] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFは公知のタンパク質であるが(非特許文献17)、非特許文献17には肉芽増生および血管新生の促進作用について記載されていないし、示唆さえされていない。

また、内因性HGFが肉芽増生および血管新生に関与することは記載されているが(非特許文献15、16)、HGFを投与した場合かかる外因性HGFが同一の現象を引き起こすか否かについては全く検討されていないうえに、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFについて記載も示唆もされていない。

特許文献1:特許第3200609号公報

非特許文献1:Suh, D.Y., Hunt, T.K. and Spencer, E.M., "Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats.", *Endocrinology*, 131, p.2399-2403(1992).

非特許文献2:Albertson, S., Hummel, R.P., 3rd, Breeden, M. and Greenhalgh, D.G., "PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice.", *Surgery*, 114, p.368-372; discussion p.372-363 (1993).

非特許文献3:Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J. and Ross, R., "PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse.", *The American Journal of Pathology*, 136, p.1235-1246 (1990).

非特許文献4:Tsuboi, R. and Rifkin, D.B., "Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice.", *Journal of*

Experimental Medicine, 172, p.245-251 (1990).

非特許文献5:Brown, R.L., Breeden, M.P. and Greenhalgh, D.G., "PDGF and TGF- α act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse.", Journal of Surgical Research, 56, p.562-570 (1994).

- [0005] 非特許文献6:Tsuboi, R., Shi, C.M., Sato, C., Cox, G.N. and Ogawa, H., "Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models.", Journal of Investigative Dermatology, 104, p.199-203 (1995).

非特許文献7:Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S., "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor.", Nature, 342, p.440-443 (1989).

非特許文献8:Boros, P. and Miller, C.M., "Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine.", Lancet, 345, p.293-295 (1995).

非特許文献9:Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.K., "The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis.", Journal of Cell Biology, 129, p.1177-1180 (1995).

非特許文献10:Matsumoto, K. and Nakamura, T., "Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases.", Kidney International, 59, p.2023-2038 (2001).

- [0006] 非特許文献11:Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Nakamura, T., "Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor.", Experimental Cell Research, 196, p.114-120 (1991).

非特許文献12:Matsumoto, K., Tajima, H. and Nakamura, T., "Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth.", Biochemical and Biophysical Research Communications, 176, p.45-51 (1991).

非特許文献13:Halaban, R., Rubin, J.S., Funasaka, Y., Cobb, M., Boulton, T., Faletto, D., Rosen, E., Chan, A., Yoko, K., White, W. and et al., "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes

and melanoma cells.”, *Oncogene*, 7, p.2195–2206 (1992).

非特許文献14: Cowin, A.J., Kallincos, N., Hatzirodos, N., Robertson, J.G., Pickering, K.J., Couper, J. and Belford, D.A., “Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats.”, *Cell and Tissue Research*, 306, p.239–250 (2001).

非特許文献15: Yoshida, S., Yamaguchi, Y., Itami, S., Yoshikawa, K., Tabata, Y., Matsumoto, K. and Nakamura, T., “Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation.”, *Journal of Investigative Dermatology*, 120, p.335–343 (2003).

非特許文献16: Toyoda, M., Takayama, H., Horiguchi, N., Otsuka, T., Fukusato, T., Merlino, G., Takagi, H. and Mori, M., “Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo.”, *FEBS Letters*, 509, p.95–100 (2001).

非特許文献17: Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. and Shimizu, S., “Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from human leukocyte.”, *Biochemical Biophysical Research Communications*, 172, 321–327 (1990)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、優れた肉芽増生および血管新生促進作用を有し組織修復に有効な医薬品、なかでも皮膚潰瘍予防治療剤として有用な医薬品を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、前記特許文献1に記載の発明についてさらに鋭意研究を重ねた結果、HGFのなかでも第一クリングドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが外因的補充によって肉芽増生および血管新生を促進させる作用に優れていることを知見した。前記ヒト組換えHGFのかかる作用を利用すれば、広く

組織修復に優れた医薬品を提供することができる。なかでも、前記ヒト組換えHGFは、糖尿病、静脈うっ滞、膠原病または熱傷などに起因する皮膚潰瘍の予防または治療に特に優れた効果を奏することを知見した。

さらに、本発明者らは検討を重ねて、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、

- (1) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療用組成物、
- (2) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする血管新生促進用組成物、
- (3) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする肉芽増生促進用組成物、
- (4) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである前記(1)～(3)のいずれかに記載の組成物；
 - (a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；または
 - (b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質、に関する。

[0010] また、本発明は

- (5) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療用組成物、
- (6) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする血管新生促進用組成物、
- (7) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする肉芽増生促進用組成物、
- (8) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、前記(5)～(7)のいずれかに記載の組成物；
 - (a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA;

(c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA;または

(d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、
に関する。

[0011] また、本発明は、

(9) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、皮膚潰瘍を治療する方法、

(10) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、血管新生を促進する方法、

(11) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、肉芽増生を促進する方法、

(12) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである前記(9)〜(10)のいずれかに記載の方法;

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質;または

(b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質、

(13) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を哺乳動物に投与し、皮膚潰瘍を治療する方法、

(14) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、血管新生を促進する方法、

(15) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、肉芽増生を促進する方法、

(16) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えH

GFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、前記(13)ー(15)のいずれかに記載の方法;

(a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA;

(b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA;

(c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA;または

(d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、
に関する。

[0012] また、本発明は、

(17) 皮膚潰瘍を治療するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用、

(18) 血管新生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用、

(19) 肉芽増生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用、

(20) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである前記(17)ー(19)のいずれかに記載の使用;

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質;または

(b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質、

(21) 皮膚潰瘍を治療するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用、

(22) 血管新生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインに

において5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用、

(23) 肉芽増生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用、

(24) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、前記(21)〜(23)のいずれかに記載の使用；

(a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA；または

(d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、

に関する。

[0013] さらに、本発明は、

(25) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有する密封型創傷被覆材、

(26) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有する組成物と、皮膚潰瘍部分からの滲出液を吸収しうる密封型創傷被覆材とを有することを特徴とする皮膚潰瘍治療用キット、

(27) 皮膚潰瘍部分からの滲出液を吸収しうる密封型創傷被覆材で創傷面を覆い、前記皮膚潰瘍部分を湿潤環境下に保ち、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを、密封型創傷被覆材中または、密封型創傷被覆材と創傷面の間に置くことを特徴とする皮膚潰瘍の治療方法、

に関する。

発明の効果

- [0014] 本発明は、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGF（以下、単に「ヒト組換えHGF」という）または前記ヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含む肉芽増生促進剤および血管新生促進剤を提供する。かかる医薬品は、皮膚潰瘍の予防または治療をはじめとして広く組織修復に利用することができる。さらに、前記ヒト組換えHGFは生体由来のものまたは生体由来のHGFを起源とするものであることから、生体に投与しても安全であり副作用が少ない。

また、上記医薬品は、密封型創傷被覆材と共に使用することにより、皮膚潰瘍部分を湿潤環境下に保つと共にヒト組換えHGFが密封状態で皮膚潰瘍面で接触できるため、組織修復の促進をはかることができる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]図1Aは実施例(3)において血管を染色した組織像を示す。図1Bはヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の血管密度を示す。図中、「生理食塩水」は生理食塩水投与群を示し、「HGF(10 μ g)」とはヒト組換えHGF投与群を示す。以下の図面も同様である。

[図2]図2Aは、ヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群における肉芽組織の増生の程度を示す。図2Bはヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の肉芽面積を示す。

[図3]ヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の潰瘍閉鎖率(治癒率)を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0016] 本発明で用いるヒト組換えHGFは、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するHGFにおいて、N末端から128〜206番目に位置する第一クリングルドメインのうち5個のアミノ酸残基が欠損している。欠損している5個のアミノ酸残基は連続して存在していてもよいし、2〜5カ所に分かれて存在していてもよいが、連続して存在している方が好ましい。本発明で用いるヒト組換えHGFとしては、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されているアミノ酸配列からなることが好ましい。なかでも、配列番号1で示される

アミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が置換されているアミノ酸配列からなることがより好ましく、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなることが特に好ましい。なお、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されているアミノ酸配列からなるタンパク質は、HGF活性、すなわちHGFと実質的に同質の機能、例えば成熟肝細胞に対する増殖促進活性を有することが好ましい。

[0017] 本発明で用いるヒト組換えHGFとしては、遺伝子組み換え技術等を用いて生産されたものに限定されず、HGFの多様なファミリーの一種として生体内に存在するものであってもよい。

遺伝子組み換え技術等を用いて本発明に用いるヒト組換えHGFを生産する方法としては公知の方法を用いてよく、例えば「Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)」(非特許文献17)に記載されている方法が好適である。

生体内から本発明のヒト組換えHGFを単離・精製する方法としては、例えば比較的高濃度にHGFを含む成熟肝細胞や血小板をトロンビン処理し、血小板外へ分泌されるHGFを取得後、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィーまたは逆相高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製する方法等が挙げられる。通常はヒトの組織または細胞を用いて本発明のヒト組換えHGFを単離・精製するが、単離されるHGFが本発明の上記条件を満たす限り、ヒト以外の哺乳動物、例えばラット、モルモット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等の組織または細胞をHGFの単離・精製のために用いてもよい。

[0018] 本発明で用いられるヒト組換えHGFは、当該技術分野で公知の種々の修飾を受けていてもよい。

例えば、本発明で用いられるヒト組換えHGFのC末端のカルボキシ基は、アミド化、エステル化またはイオン化されていてもよい。具体的には、C末端のカルボキシ基($-\text{COOH}$)がカルボキシレート($-\text{COO}^-$)、アミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)に置換されていてもよい。ここでエステルにおける置換基Rとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₆アルキル

基;例えばシクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈ シクロアルキル基;例えばフェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂ アリール基;例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂ アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂ アルキル基などのC₇₋₁₄ アラルキル基;ピバロイルオキシメチル基などが挙げられる。さらに、本発明で用いられるヒト組換えHGFがC末端以外にカルボキシル基を有している場合、上記と同様にカルボキシル基がアミド化、エステル化またはイオン化されていてもよい。

[0019] 本発明に用いられるヒト組換えHGFとしては、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆ アルカノイル基などのC₁₋₆ アシル基など)で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、アミノ酸側鎖上の置換基(例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₋₆ アルカノイル基などのC₁₋₆ アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。なかでも、本発明に用いられるヒト組換えHGFとしては糖鎖が結合しているものが望ましく、結合する糖としてはフコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミンなどが挙げられる。

[0020] 本発明に用いられるヒト組換えHGFは薬理学的に許容される塩を形成していてもよい。本発明のヒト組換えHGFが塩基性を示す場合、前記薬理学的に許容される塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、または有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが挙げられる。本発明のヒト組換えHGFが酸性を示す場合、前記薬理学的に許容される塩としては、無機塩基(例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩もしくはマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩またはアンモニウム塩など)との塩、または有機塩基(例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミンもしくはN,N'-ジベンジルエチレンジアミンなど)との

塩などが挙げられる。

[0021] 本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子としては、上述してきたヒト組換えHGFをコードする遺伝子であれば特に限定されないが、(a)配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNA、または(b)配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、HGF活性、すなわちHGFと実質的に同質の機能、例えば成熟肝細胞に対する増殖促進活性等を有するタンパク質をコードするDNA等が好適な例として挙げられる。本発明では、配列番号2で表わされる塩基配列を含むまたはからなるDNAを用いることが特に好ましい。

[0022] 配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAとは、例えば上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはプラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、約0.7〜1.0M程度の塩化ナトリウム存在下、約65℃程度でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1〜2倍程度の濃度のSSC溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる)を用いて約65℃程度の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

上記の配列番号2で表される塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAとして具体的には、配列番号2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、公知の方法、例えばモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001:以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

[0023] 本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、ゲノムDNA、ゲノムD

NAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することによりヒト組換えHGFをコードするDNAを得ることもできる。また、RNAも、逆転写酵素により本発明のヒト組換えHGFを発現することができるものであれば用いることができる。該RNAも公知の手段により得ることができる。

[0024] 本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子は公知の方法により得ることができ、例えば前記「Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)」(非特許文献17)に記載されている方法を用いることが好ましい。さらに、得られた遺伝子に対して公知の処理を施してもよい。例えば、DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造)、MutanTM-K (宝酒造)等を用いて、ODA-LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。また、制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりすることもできる。さらに、翻訳開始コドン(ATG)や翻訳終止コドン(TAA、TGAまたはTAG)を適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

[0025] 本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、細胞内でのその安定性を高めるため、また、もし毒性があるならその毒性をより小さなものにするために修飾されていてもよい。このような修飾には、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol.8, p247(1992); Vol.8, p395(1992); S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press (1993)等に記載された方法による修飾が挙げられる。さらに、アデニン、チミジン、グアニンおよびシトシン以外の他の物質の付加による修飾も挙げられる。前記他の物質としては、糖;酸または塩基;リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体;脂質などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、細胞膜との相互作用の向上または核酸の取込みの増大に寄与するものが好ましく、具体的にはコレステロールやその誘導体(例えば

コレステリルクロホルメートまたはコール酸等)またはホスホリピドなどが挙げられる。前記他の物質は、核酸の3'末端あるいは5'末端に付着させることもできるし、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることもできる。また、本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子の修飾として、遺伝子の末端の化学修飾も挙げられる。末端の修飾基としては、核酸の3'末端あるいは5'末端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼまたはRNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。前記キャップ用の基としては、ポリエチレングリコールまたはテトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

- [0026] 本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は製剤化する際にそのまま用いてもよいが、発現ベクターに挿入した形態で用いてもよい。前記発現ベクターは本発明のヒト組換えHGFを発現することができればよく、例えば本発明のヒト組換えHGFをコードするDNA断片が適当なプロモーターの下流に連結されているベクターなどが挙げられる。
- [0027] 前記発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2. 1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス(HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等のウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。中でも、ウイルスが好ましく、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス(HIV)、センダイウイルス、エプスタインバーウイルス(EBV)、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等を用いることが好ましい。さらにアデノ随伴ウイルス(AAV)またはアデノウイルス等を用いることがより好ましい。アデノウイルスには種々の血清型が存在するが、本発明では2型または5型ヒトアデノイ

ルスを使用することが好ましい。

また、発現ベクターを後述するように宿主細胞に導入せず裸のベクターとして生体にin vivo導入する場合、使用される発現ベクターとしてはpCAGGS[Gene, 108, p193-200 (1991)], pBK-CMV、pcDNA3. 1、pZeoSV (インビトロゲン社、ストラジーン社)等のプラスミドが好ましい。

[0028] 前記プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に応じた適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合はtrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーターまたはlppプロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合はSPO1プロモーター、SPO2プロモーターまたはpenPプロモーターなどが好ましく、宿主が酵母である場合はPHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーターまたはADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

[0029] 前記発現ベクターは、本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子およびプロモーターの他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカーまたはSV40複製オリジンなどを有していてもよい。選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素(以下dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子(G418耐性)等が挙げられる。特にdhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、シグナル配列としては、宿主がエシェリヒア属菌である場合はPhoA・シグナル配列もしくはOmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は α -アミラーゼ・シグナル配列もしくはサブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合はMF α ・シグナル配列もしくはSUC2・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合にはインシュリン・シグナル配列、 α

ーインターフェロン・シグナル配列もしくは抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

- [0030] このようにして構築された本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有する発現ベクターは、さらに宿主に導入し形質転換体の形態で製剤化の際に用いることができる。形質転換体を投与することにより、投与された生体内において本発明のヒト組換えHGFが形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に生成され、本発明のヒト組換えHGFを生体に有効に投与することができる。

上記発現ベクターを導入する宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、ビフィズス菌、乳酸菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、*Escherichia coli* K12・DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160 (1968))、JM103 (Nucleic Acids Research, 9巻, 309(1981))、JA221 (Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978))、HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459 (1969)]、C600 (Genetics, 39巻, 440 (1954))、DH5 α (Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23–28 (1990))、DH10B (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87巻, 4645–4649 (1990))等が挙げられる。バチルス属菌としては、例えば *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, 24巻, 255 (1983))、*Journal of Biochemistry*, 95巻, 87 (1984))等が挙げられる。ビフィズス菌としては、例えば *Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium breve*等が挙げられる。乳酸菌としては、例えばラクトバチラス属 (*Lactobacillus*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、ロイコノストック属 (*Leuconostoc*)、ペディオコッカス属 (*Pediococcus*)等が挙げられる。酵母としては、例えば *Saccharomyces cerevisiae* AH22、AH22R⁺、NA87–11A、DKD–5D、20B–12、*Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913、NCYC2036、*Pichia pastoris*等が挙げられる。

- [0031] 昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestrabrassicae*由来の細胞または *Estigmena acrea*由来の細胞などが挙げられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞)などが挙げられる。該Sf細胞としては、例

えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L. et. al., In Vivo, 13, p213-217 (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が挙げられる(前田ら、Nature, 315, 592 (1985))。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが挙げられる。

[0032] エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, p2110 (1972)」や「Gene, 17, p107 (1982)」等に記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば「Molecular & General Genetics, 168, p111 (1979)」等に記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば「Methods in Enzymology, 194巻, p182-187 (1991)」、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)」等に記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば「Bio/Technology, 6, p47-55 (1988)」等に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば「細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコル, p263-267 (1995) (秀潤社発行)」、「Virology, 52巻, p456 (1973)」等に記載の方法に従って行うことができる。

[0033] このようにして得られた形質転換体を培養することにより、本発明にかかる薬剤の原料を多量に得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉またはショ糖などが挙げられ、窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕またはバレイショ抽出液などの無機または有機物質が挙げられ、無機物としては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウムまたは塩化マグネシウムなどが挙げられる。さらに、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5-8が望ましい。

[0034] エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコースおよびカザミノ酸

を含むM9培地(Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, p431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1972))が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば 3β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー(Burkholder)最小培地(Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p4505 (1980))や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, p5330 (1984))等が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃〜35℃で約24〜72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

[0035] 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としてはGrace's Insect Medium(Grace, T.C.C., Nature, 195, p788 (1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては例えば約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地(Science, 122, p501 (1952)), DME M培地(Virology, 8, p396 (1959)), RPMI 1640培地(The Journal of the American Medical Association, 199, p519 (1967)), 199培地(Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, p1 (1950))等が用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30℃〜40℃で約15〜60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

[0036] 本発明においては、製剤化の際に本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子または前記遺伝子を有する発現ベクターを、リポソーム、マイクロカプセル、ミクロスフェア、サイトフェクチン、DNA-タンパク質複合体またはバイオポリマー等の人工ベクターに内包させた形態で用いてもよい。中でも、リポソームまたはマイクロカプセルに内包することが好ましい。

- [0037] ここで、リポソームとは内部に水層を有する脂質二重膜でできた閉鎖小胞体であり、その脂質二分子膜構造が生体膜に極めて近似していることが知られている。リポソームを製造するに際し使用されるリン脂質としては、例えばレシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の酸性リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等が挙げられる。また、コレステロール等を添加することもできる。リポソームは、自体公知の方法に従って製造することができる。リポソームには、膜融合リポソーム、HVJ-膜融合リポソーム(Kaneda. Y et al., Biol. Chem, 264, p12126-12129 (1989)、Kato. K et al., Biol. Chem, 266, p3361-3364 (1991)、Tomita. N et al., Biochem. Biophys. Res., 186, p129-134 (1992)、Tomota. N et al., Cric. Res., 73, p898-905 (1993))、陽イオン性リポソーム(特表2000-510151号公報、特表2000-516630号公報)等が知られている。センダウイルス(HVJ)と融合させたHVJ-膜融合リポソームを用いることが本発明において好ましい。リポソームの表面にHVJの糖タンパクを組み込み、または共有結合させてポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入効率が上昇する。マイクロカプセルはフィルムコートされた粒子であり、膜形成ポリマー誘導体、疎水性可塑剤、表面活性剤または／および潤滑剤窒素含有ポリマーの混合物からなるコーティング材料でコートされた粒子等で構成されるものが挙げられる。
- [0038] 本発明の皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤および肉芽増生促進剤(以下、これらを総称して「本発明の薬剤」という)は、上述してきた本発明のヒト組換えHGFまたは本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有効成分として含む。本発明の薬剤としては、(a)本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤、(b)本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含む形質転換体を含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤、(c)本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子または本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含むリポソームまたはマイクロカプセル等を含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤も含まれる。
- [0039] 本発明の薬剤は、上記有効成分を通常は当該技術分野で用いられている製剤用

添加剤とともに常法に従って製剤化することにより製造される。本発明の薬剤の剤形は特に限定されず、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、坐剤、注射剤、ペースト剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、ゲル状クリーム剤、ローション剤、乳剤、懸濁剤、湿布剤、硬膏剤、リニメント剤、エアゾール剤、シロップ剤、口腔剤、点眼剤または点鼻剤などが挙げられる。前記錠剤は、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠もしくはフィルムコーティング錠などのコーティングを施した錠剤、または二重錠や多層錠であってよい。

[0040] 上記のような医薬製剤は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。

錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤または顆粒剤などの固形製剤の製造には、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤または滑沢剤などを製剤用添加物として用いることができる。賦形剤としては、例えば乳糖、白糖もしくはブドウ糖等の糖類、デンプン等のデンプン類、結晶セルロース等が挙げられる。結合剤としては、例えばグルコースやマルチトールなどの糖類もしくは糖アルコール類、デンプンなどの多糖類、ゼラチンなどの天然高分子類、メチルセルロースもしくはカルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子化合物等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば澱粉、アルギン酸ソーダ、コーンスターチ、ヒドロキシプロピルスターチ、ポリビニルピロリドンまたはクロスカルメロースナトリウム等が挙げられる。滑沢剤としては、例えばステアリン酸塩、タルク、ホウ酸末またはポリエチレングリコール等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば脂肪酸エステル等が挙げられる。

[0041] 本発明の薬剤が坐剤の剤形を有する場合は、親油性基剤、水溶性基剤または乳剤性基剤に、上記有効成分、および所望により、例えば局所麻酔薬、抗ヒスタミン剤、局所収れん剤、サルファ剤、抗生物質、瘡傷治療薬、界面活性剤、ビタミン類、生薬エキス、胆汁酸類、防腐剤、賦形剤、吸収促進剤またはアミノ酸等の製剤用添加物を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

[0042] 本発明の薬剤が注射剤の剤形を有する場合は、水溶性溶剤または非水溶性溶剤などの溶剤に、上記有効成分、および所望により溶解補助剤、緩衝剤または無痛化

剤等の製剤用添加剤等の製剤用添加物を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。前記注射剤は、殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましく、血液と等張にするために食塩、ブドウ糖またはグリセリンなどを含有していてもよい。さらに、所望により着色料、保存料、香料、風味剤、甘味剤等を医薬製剤中に含有していてもよい。

[0043] 本発明の薬剤が軟膏剤の剤形を有する場合、例えばワセリン、流動パラフィン、シリコンもしくは植物油などの油脂性基剤；例えば親水ワセリンもしくは精製ラノリンなどの乳剤性基剤；例えばマクロゴールなどの水溶性基剤などの基剤に、上記有効成分、および所望により例えば陰イオン型もしくは非イオン型界面活性剤などの乳化剤またはパラオキシ安息香酸エステル類などの保存剤等の製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

[0044] 本発明の薬剤がゲル剤の剤形を有する場合、水にゲル化剤（例えばカルボキシビニル重合体、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはアルギン酸プロピレングリコールエステル等）などを加えて得られる基剤に、上記有効成分、および所望により、例えば低級アルコール、中和剤、界面活性剤または吸収促進剤などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

[0045] 本発明の薬剤がクリーム剤の剤形を有する場合、例えば高級脂肪酸エステル類（例えばミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、セバシン酸ジエチル、ラウリン酸ヘキシル、イソオクタン酸セチル等）、低級アルコール（例えばエタノール、イソプロパノール等）、炭水化物（例えば流動パラフィン、スクワラン等）、多価アルコール（例えばプロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール等）または高級アルコール（例えば2-ヘキシルデカノール、セタノール、2-オクチルドデカノール等）等を含む基剤に、上記有効成分、および所望により、例えば乳化剤、防腐剤、吸収促進剤またはかぶれ防止剤などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

また、クリーム剤とゲル剤の中間の性質を有するゲル状クリーム剤とするためには、上記のクリーム剤にゲル化剤および中和剤を加えればよい。

[0046] 本発明の薬剤が外用液剤の剤形を有する場合、溶剤に、上記有効成分、および所望により、例えば緩衝剤、安定化剤、防腐剤、pH調製剤、溶剤、溶解補助剤、着香剤、ゲル化剤、矯味剤または清涼化剤等などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。前記溶剤としては、例えばグリセリン、プロピレングリコール、エタノール、イソプロパノール、ブチレングリコール、水、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、ブドウ糖、イプシロンアミノカプロン酸、グリシン、グルタミン酸塩、ヒアルロン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール類、カルボキシビニルポリマー類やセタノール、ステアリルアルコールなどの高級アルコール類、中鎖脂肪酸エステル類やミリスチン酸イソプロピルなどの脂肪酸エステル類、ステアリン酸などの高級脂肪酸、スクワラン、流動パラフィン、白色ワセリンまたは精製ラノリンなどを挙げることができる。

ここで、外用液剤としては、洗浄、注入、湿布、吸入、噴霧、浣腸、塗布、薬浴、清拭、消毒、点眼、洗眼、点耳または点鼻など外用に供する液体製剤が挙げられる。

[0047] 本発明の外用液剤を通常噴射剤と共に用いることによりエアゾール剤を製造することができる。噴射剤としては通常エアゾールに用いられるジメチルエーテル、液化石油ガス、 N_2 ガス、亜酸化窒素ガス、 CO_2 ガス、代替フロンガス等を挙げることができる。噴射剤を用いずに圧縮空気を用いることもできる。また、これらの混合物を用いてもよい。

[0048] 本発明の薬剤については、経口投与、非経口投与または局所投与など種々の投与方法の中から、その剤形に応じて投与方法を適宜選択すればよい。本発明の薬剤は皮下または筋肉内等に埋め込むこともできる。

本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、上述のように製剤化せずに、そのまままたは摂取促進のための補助剤とともに直接生体に投与することもできる。かかる投与方法は公知の方法に従って行ってもよいが、例えばDNAを直接体内に導入するin vivo法、または投与されるヒト等からある種の細胞を体外に取り出して当該細胞にヒト組換えHGFをコードする遺伝子を導入し、その形質転換細胞を体内に戻すex vivo法がある(日経サイエンス、4月号、20-45(1994)、月間薬事、36、23-48(1994)、実験医学増刊、12、15(1994))。それぞれの方法において、本発明のヒト組

換えHGFをコードする遺伝子を細胞に導入する方法としては、上述したようにアデノ随伴ウイルス、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等の発現ベクターに遺伝子を含ませて該発現ベクター等を細胞に導入する遺伝子導入方法、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子銃で担体(金属粒子等)とともにDNAを細胞内に導入する方法等(Wu et al., J. Biol. Chem. 267, 963-967(1992)、Wu et al., J. Biol. Chem. 263, 14621-14624, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 2726-2730 (1991))が挙げられる。またリポソーム等を用いる場合には、リポソーム法、HVJ-リポソーム法、陽イオン性リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法等が挙げられる。中でも、導入効率の観点から、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

- [0049] また、本発明の皮膚潰瘍治療剤、血管新生促進剤および肉芽増生促進剤が外用剤として使用される場合、密封型創傷被覆材と共に使用されることが好ましい。密封型創傷被覆材は、創傷部での湿潤環境を提供し、かつ液体や細菌などを透過させずに酸素や水蒸気を透過できる被覆材が好ましい。このような密封型創傷被覆材としては、例えば、ハイドロコロイドドレッシング材[例. デュオアクティブ(Convatec), コムフィール(コロプラスト), テガソープ(3M), アブソキュア(日東メディカル)], キチンドレッシング材, アルギン酸塩ドレッシング材[例. カルトスタット(Convatec), ソーブサン(アルケア), アルゴダーム(メディコン), クラビオAG(クラレ)], ハイドロジェルドレッシング材[例. ジェリパーム(竹虎), ニュージェル(Johnson & Johnson), イントラサイト(Smith & Nephew), グラニュゲル(Convatec), クリアサイト(日本シグマックス)], ポリウレタンドレッシング材[例. テガダーム(3M), オブサイトウンド(Smith & Nephew), IV3000(Smith & Nephew), バイオクルーシブ(Johnson & Johnson)], ハイドロポリマードレッシング材[例. ティエール(Johnson & Johnson)], ハイドロファイバードレッシング材またはポリウレタンフォーム[例. ハイドロサイト(Smith & Nephew)]などのドレッシング材が好ましく挙げられる。これらドレッシング材は1若しくは2以上を組合わせて用いることもできる。また、ドレッシング材は皮膚貼付用粘着シート状、フィルム状などの形態であってもよい。

- [0050] 本発明の外用剤を密封型創傷被覆材と共に使用する形態としては、密封型創傷被覆材に本発明の外用剤を含有させてもよく、または本発明の外用剤を塗布などした後に密封型創傷被覆材で損傷部位を被覆する形態であってもよく、あるいは密封型創傷被覆材で損傷部位を被覆した後に、例えば注射器などで、本発明の外用剤を注入などする形態であってもよい。
- [0051] 密封型創傷被覆材に本発明の外用剤を含有させる場合、通常は密封型創傷被覆材の吸収材層（例えば、ヒドロゲル層など）に本発明の外用剤を含有させることが好ましい。この場合、ヒト組換えHGFは、吸収材層の乾燥重量を基準として0.01質量%～5質量%、好ましくは0.1質量%～3質量%の量添加されるのがよい。吸収材層にヒト組換えHGFを含有させることにより、例えば滲出液によって吸収材層が濡れるにつれてヒト組換えHGFの放出レベルを高めることができる。また、本発明の外用剤を塗布などした後に密封型創傷被覆材で損傷部位を被覆する場合は、本発明の外用剤が外部に漏出しないという利点がある。また、あるいは密封型創傷被覆材で損傷部位を被覆した後に、例えば注射器などで、創傷面または創傷被覆材の吸収剤層に本発明の外用剤を注入することにより、創傷面を外気にさらすことなく本発明の外用剤を投与できる。
- [0052] 本発明の薬剤の投与量および投与頻度は特に限定されず、治療すべき病態の種類、患者の年齢および体重、症状および疾患の重篤度などの種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。例えば静脈投与の場合、その投与量はヒト組換えHGFとして約250～1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、好ましくは約300～800 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、特に好ましくは、約300～550 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ であり、ヒト組換えHGFをコードする遺伝子として約0.2～40,000 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ 、好ましくは約2～2,000 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{日}$ である。外用薬などによる局所投与の場合、有効成分の投与量は約0.001～30mg程度、好ましくは約0.01～3mg程度である。
- [0053] 本発明の薬剤は、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤として使用することができる。さらに、血管新生促進作用または肉芽増生促進作用を利用して皮膚潰瘍予防治療をはじめ、消化性潰瘍治療、抗ガン、手術後の皮膚縫合、角膜手術などにおける医薬品的用途はもちろん、育毛剤または化粧品として用いることもできる。

実施例

[0054] 以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことは言うまでもない。

(1) 本発明のヒト組換えHGFの作製

「Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. and Shimizu, S., “Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from human leukocyte.”, Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)」に記載の方法に従って、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを発現ベクターを導入したCHO細胞の培養上清から精製した。ヒト組換えHGFの精製度はSDSゲル電気泳動後のタンパク質染色から98%以上であった。なお、前記第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFのアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0055] (2) 皮膚潰瘍モデルの作成とヒト組換えHGFの局所投与

糖尿病を自然発症する変異マウス(C57BL/KsJ-db/db、10週齢の雌)を実験に使用した。各マウスの背部に2カ所、パンチバイオブシー(皮膚生検採取用器具)を用いて直径6mmの皮膚全層欠損潰瘍モデルを作成した。その後透明の半透過性被覆材(BIOCLUSIVE, Johnson & Johnson MEDICAL)にて潰瘍部を覆った。全層欠損処置を行った日を0日目として、27ゲージの注射針を使用して被覆材の上から潰瘍部に(1)において調整したヒト組換えHGFの溶液または比較例としての生理食塩水(25 μ l)を潰瘍モデル作成直後から連日投与した。ヒト組換えHGFの投与量は10 μ g/潰瘍/日である。マウスを潰瘍モデル作成後、7日目、14日目、21日目ならびに28日目に潰瘍部の解析を行った。

[0056] (3) 組織学的解析ならびに血管新生の解析

血管の組織染色を行う場合、70%エタノールにて固定パラフィン包埋した切片を0.1%トリプシンにて室温で10分間処理し、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)による洗浄後、3%過酸化水素を含むPBSにて30分間処理した。次に切片を抗CD31/PECAM-1抗体(Phar Mingen社の抗体を50倍に希釈したもの)にて室温にて2時間イ

ンキュベートした後、ビオチン標識西洋ワサビパーオキシダーゼ結合抗ラットIgG抗体(DAKO社の抗体を200倍に希釈したもの)にて30分間インキュベートした。ジアミノベンチジンと過酸化水素を含む基質溶液中で酵素抗体反応を検出し、検出後ヘマトキシリンにて細胞核を染色した。切片の顕微鏡観察(100倍の視野)によって血管密度を定量した。

[0057] (4) 肉芽組織の解析

肉芽組織を測定する場合、ヘマトキシリンならびにエオジン染色した組織切片を使用した。潰瘍部表面に対して垂直になるように調製した組織切片の画像をコンピューターに取り込み、肉芽組織をトレースした後、NIH画像解析ソフトウェアにて肉芽組織の面積を定量した。

[0058] (5) 潰瘍部の閉鎖(治癒)率の決定

潰瘍部の閉鎖(治癒)を測定するため、潰瘍部片縁をスライドガラス上にトレースした後、CCDカメラにてコンピューターに取り込み、NIH画像解析用ソフトウェアを用いる画像解析によって潰瘍部の面積を定量した。潰瘍部の閉鎖率が0%は潰瘍部の閉鎖が認められない状態に相当し、100%は潰瘍部の閉鎖が完了したことに相当している。

[0059] 上記実験の結果を以下に示す。

(結果-1) ヒト組換えHGFによる血管新生の促進

血管新生は皮膚潰瘍の治癒を含め組織修復において重要な役割を担っていることから、血管新生に対するヒト組換えHGFの効果を解析した。皮膚潰瘍モデル作成7日後の組織切片を用いて免疫染色によって血管を検出した(図1Aに血管を染色した組織像を示す)。その結果、対照(生理食塩水投与群)での血管密度は $33.4 \pm 6.0 / \text{mm}^2$ であったのに対して、 $10 \mu\text{g} / \text{潰瘍} / \text{日}$ のヒト組換えHGF投与によって血管密度は $59.6 \pm 4.5 / \text{mm}^2$ に促進された(図1B)。したがって、ヒト組換えHGFは血管新生を促進することが明らかとなった。

[0060] (結果-2) ヒト組換えHGFによる肉芽組織の増生促進

肉芽組織の増生に対するヒト組換えHGFの効果を調べた(図2A)。肉芽組織の増生は皮膚潰瘍モデル作成後7日目の組織切片を用いた画像解析によって測定した

。その結果、皮膚潰瘍モデル作成後の組織を調べると、ヒト組換えHGFの投与によって肉芽組織の増生が認められた(図2A)。画像解析の結果、対照(生理食塩水投与群)においては肉芽組織の面積が $1.30 \pm 0.15 \text{ mm}^2$ であったのに対して、ヒト組換えHGFは容量依存的に肉芽組織の面積を促進し、 $10 \mu\text{g}/\text{潰瘍}/\text{日}$ のヒト組換えHGF投与によって肉芽組織の面積は対照の2.3倍に増大し、ヒト組換えHGFは肉芽組織の増生を促進することが認められた(図2B)。

[0061] (結果-3)ヒト組換えHGFによる潰瘍部の閉鎖(治癒)の促進

皮膚潰瘍部にヒト組換えHGF($10 \mu\text{g}/\text{潰瘍}/\text{日}$)を連日5日間投与した。その結果、ヒト組換えHGFによる容量依存的な潰瘍部の閉鎖(治癒)促進が2日後から認められた。潰瘍モデル作成10日後、生理食塩水を投与した対照の皮膚においては、潰瘍閉鎖率(治癒率)が $41.1 \pm 6.8\%$ であった。これに対して、 $10 \mu\text{g}/\text{潰瘍}/\text{日}$ のヒト組換えHGF投与によって潰瘍閉鎖率(治癒率)が $85.0 \pm 4.0\%$ に促進された。また、対照(生理食塩水投与群)では潰瘍部の閉鎖(治癒)完了に21日要したのに対して、 $10 \mu\text{g}/\text{潰瘍}/\text{日}$ のヒト組換えHGF投与によって14日において潰瘍部の閉鎖(治癒)完了が認められた(図3)。

請求の範囲

- [1] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療用組成物。
- [2] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする血管新生促進用組成物。
- [3] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする肉芽増生促進用組成物。
- [4] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである請求項1〜3のいずれかに記載の組成物；
 - (a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；または
 - (b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質。
- [5] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療用組成物。
- [6] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする血管新生促進用組成物。
- [7] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする肉芽増生促進用組成物。
- [8] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、請求項5〜7のいずれかに記載の組成物；
 - (a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA；
 - (b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA；
 - (c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA；または
 - (d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の

相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。

- [9] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、皮膚潰瘍を治療する方法。
- [10] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、血管新生を促進する方法。
- [11] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、肉芽増生を促進する方法。
- [12] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである請求項9～11のいずれかに記載の方法;
 - (a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質;または
 - (b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質。
- [13] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を哺乳動物に投与し、皮膚潰瘍を治療する方法。
- [14] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、血管新生を促進する方法。
- [15] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを哺乳動物に投与し、肉芽増生を促進する方法。
- [16] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、請求項13～15に記載の方法;
 - (a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA;
 - (b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA;
 - (c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA;または

(d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。

[17] 皮膚潰瘍を治療するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用。

[18] 血管新生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用。

[19] 肉芽増生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFの使用。

[20] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが次のいずれかである請求項17〜19のいずれかに記載の使用；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；または

(b) 配列表の配列番号1において、1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質。

[21] 皮膚潰瘍を治療するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用。

[22] 血管新生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用。

[23] 肉芽増生を促進するための医薬を製造するための、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子の使用。

[24] (24) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、請求項21〜23のいずれかに記載の使用；

(a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号2において、1乃至数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードするDNA；

(c) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつHGF活性を有するタン

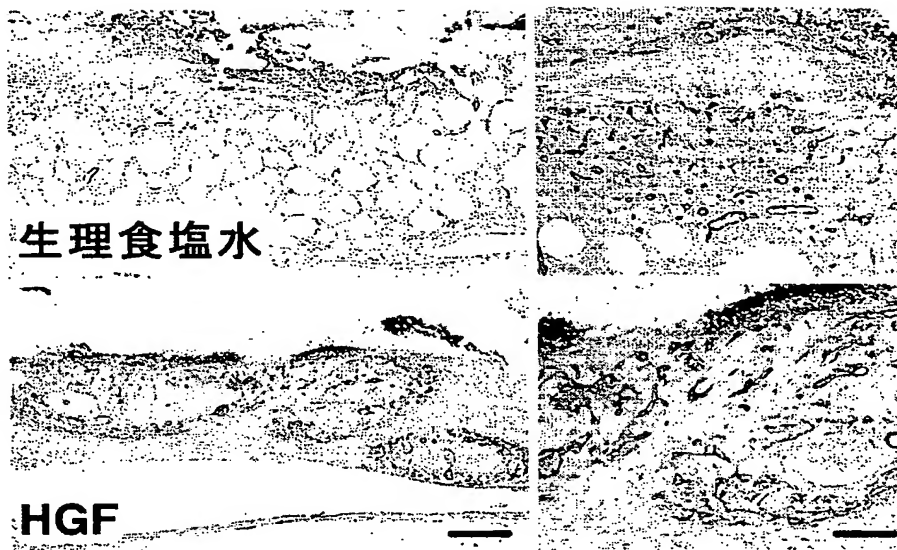
パク質をコードする塩基配列からなるDNA;または

(d) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも70%以上の相同性を有し、かつHGF活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。

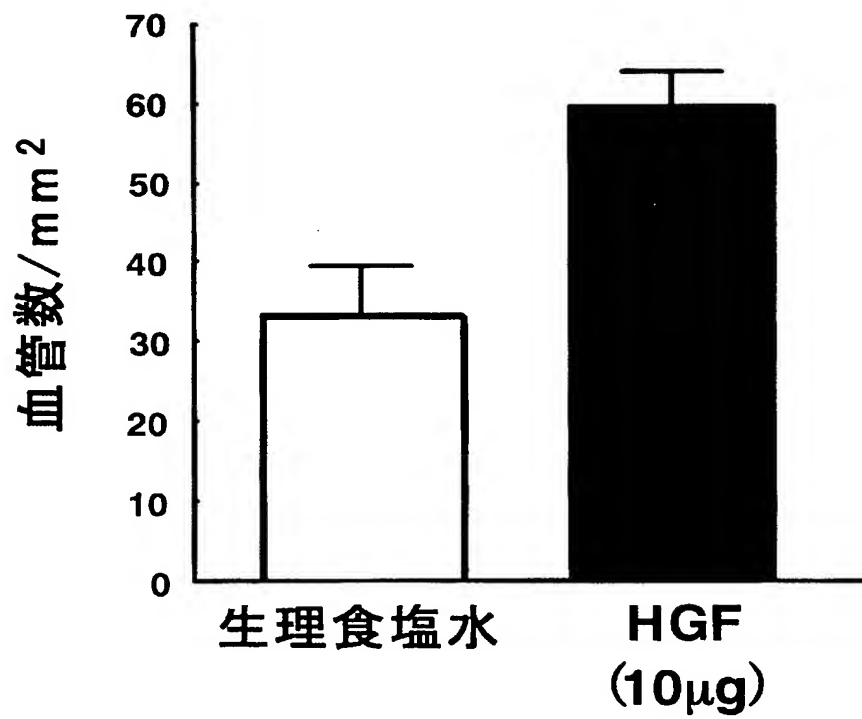
- [25] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有する密封型創傷被覆材。
- [26] 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有する組成物と、皮膚潰瘍部分からの滲出液を吸収しうる密封型創傷被覆材とを有することを特徴とする皮膚潰瘍治療用キット。
- [27] 皮膚潰瘍部分からの滲出液を吸収しうる密封型創傷被覆材で創傷面を覆い、前記皮膚潰瘍部分を湿潤環境下に保ち、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを、密封型創傷被覆材中または、密封型創傷被覆材と創傷面の間に置くことを特徴とする皮膚潰瘍の治療方法。

[図1]

A.



B.



[図2]

A.

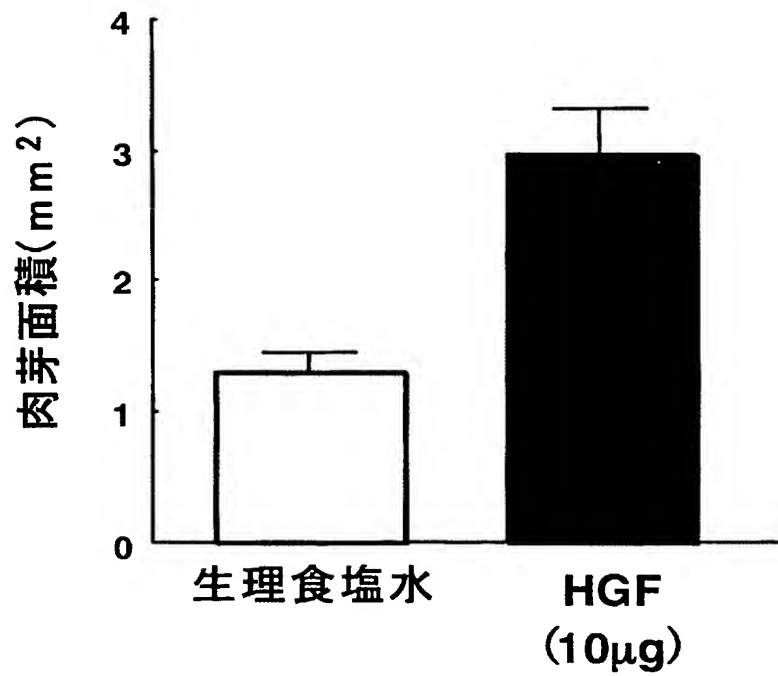


生理食塩水

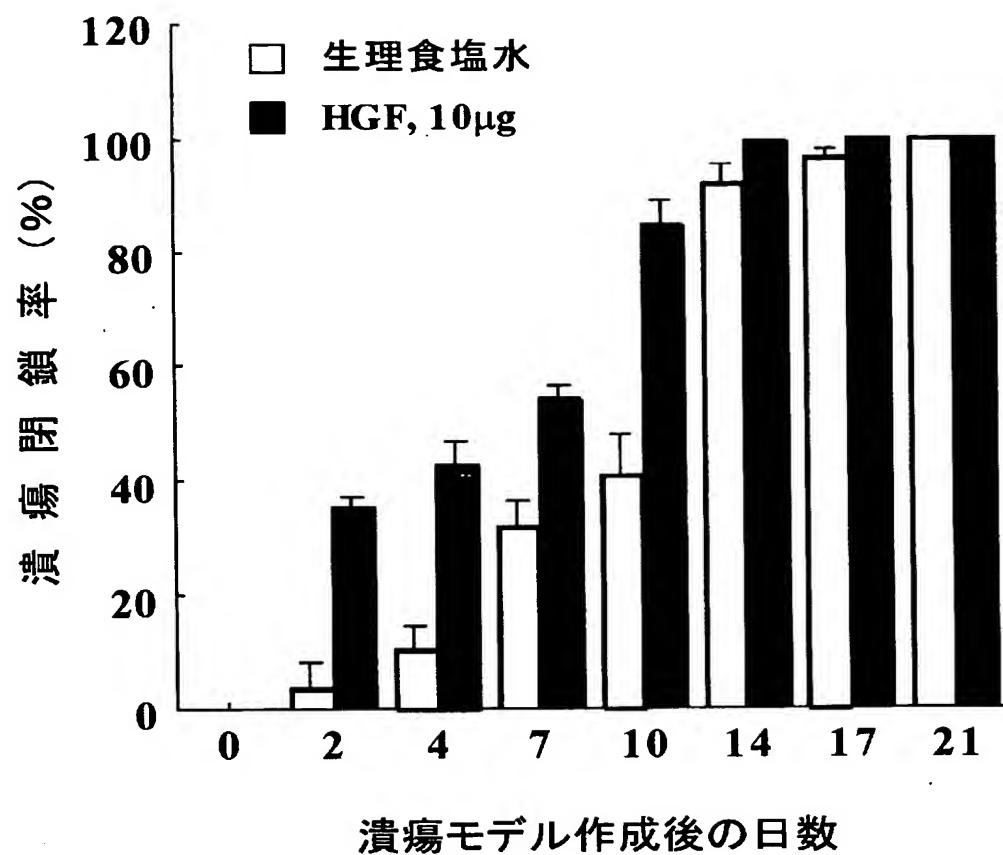


HGF

B.



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/18, 9/70, A61P17/02, 9/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/18, 9/70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5821223 A (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services), 13 October, 1995 (13.10.95), Claims; examples; table 1 (Family: none)	1-8, 17-26
Y		1-8, 17-26
Y	Toyoda, M. et al., Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo, FEBS Letter, 2001, Vol.509, pages 95 to 100	1-8, 17-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 October, 2004 (14.10.04)

Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012361

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEKI, T. et al., ISOLATION AND EXPRESSION OF cDNA FOR DIFFERENT FORMS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR FROM HUMAN LEUKOCYTE, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 1990, Vol.172, No.1, pages 321 to 327	1-8,17-26
A	JP 7-179356 A (Toshikazu NAKAMURA), 18 July, 1995 (18.07.95), Full text (Family: none)	1-8,17-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012361

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9-16, 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 to 16 and 27 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ A61K38/18, 9/70, A61P17/02, 9/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁷ A61K38/18, 9/70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 5821223 A (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services) 1995. 10. 13, Claims, Examples, Table 1 (ファミリーなし)	1-8, 17-26
Y		1-8, 17-26
Y	Toyoda, M. et al, Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo, FEBS Letter, 2001, Vol.509, pp.95-100,	1-8, 17-26

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 10. 2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
川口 裕美子

4C 3127

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SEKI, T. et al, ISOLATION AND EXPRESSION OF cDNA FOR DIFFERENT FORMS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR FROM HUMAN LEUKOCYTE, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESERCH COMMUNICATIONS, 1990, Vol.172, No.1, pp.321-327,	1-8, 17-26
A	J P 7-179356 A (中村敏一) 1995. 07. 18, 全文 (フ ァミリーなし)	1-8, 17-26

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9-16, 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲9-16, 27は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。